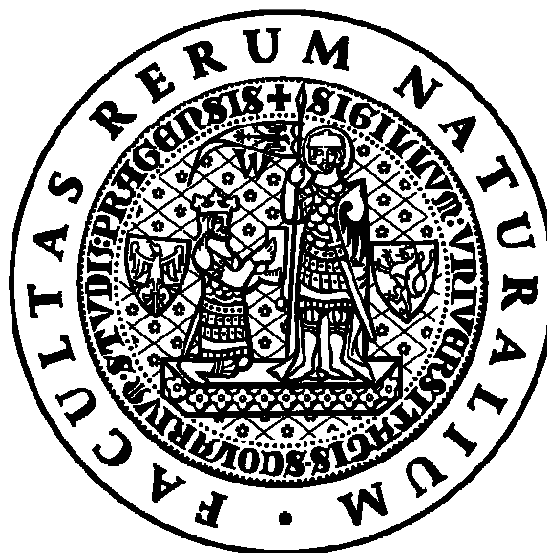


Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biochemie

Studijní obor: Biochemie



Petra Škodová

Enzymy metabolizující léčiva

Enzymes metabolizing drugs

Bakalářská práce

Školitelka: prof. RNDr. Marie Stiborová, DrSc.

Praha, 2011

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 30.5.2011

Petra Škodová

Poděkování:

Ráda bych poděkovala své školitelce prof. RNDr. Marii Stiborové, DrSc. za zadání zajímavého tématu a především za její cenné rady, trpělivý a obětavý přístup při psaní této práce.

Práce byla vypracována jako součást řešení grantů GAČR (P301/10/0356) a MŠMT ČR (MSM 0021620808 a 1M0505).

Abstrakt

Nejúčinnějším systémem enzymů první fáze biotransformace xenobiotik je systém monooxygenas se smíšenou funkcí (MFO). Jeho nejdůležitější součástí jsou cytochromy P450, enzymy fungující jako terminální oxidasa tohoto systému, který obsahuje také další komponenty, jako jsou NADPH:CYP reduktasa a membránové lipidy. Mezi substráty těchto enzymů se řadí široká škála xenobiotik včetně léčiv, kromě xenobiotik ale mohou sloužit jako substráty také endogenní látky. K enzymům schopným metabolizovat léčiva patří také peroxidasy. V některých orgánech peroxidasy doplňují funkci cytochromů P450. Obě skupiny enzymů jsou schopné jak potencovat účinek léčiv tím, že je aktivují, tak je i deaktivovat do metabolitů, které jsou z organismu exkretovány. Působení cytochromů P450 a peroxidas je ukázáno na metabolismu léčiva ellipticinu, který vykazuje protinádorové účinky. Výhodou tohoto léčiva jsou jeho malé vedlejší účinky. Oxidace ellipticinu cytochromy P450 a peroxidasami vede buď k jeho metabolické aktivaci, nebo jeho detoxikaci. Ze dvou aktivních metabolitů, 12-hydroxyellipticinu a 13-hydroxyellipticinu, vznikají spontánním štěpením karbeniové iony, které tvoří adukty s deoxyguanosinovou bází v DNA. V některých tkáních může ellipticin působit také jako induktor cytochromů P450.

Klíčová slova

Cytochromy P450, peroxidasy, metabolismus léčiv, ellipticin.

Abstract

Mixed function oxidase system (MFO) is one of the most effective systems of enzymes of the first phase of biotransformation of xenobiotics. Cytochromes P450 seem to be the most important part of the MFO system, which also contains other components such as NADPH:CYP reductase and membrane lipids. Cytochromes P450 function as a terminal oxidase of the mixed function oxidase (MFO) system. Many xenobiotics, including drugs, are the substrates of these enzymes. Endogenous substances can serve as the substrates of these enzymes as well. Peroxidases are a group of enzymes which are able to metabolize drugs. The function of cytochromes P450 can be substituted by peroxidases. Both groups of enzymes are able to potentiate the effect of the drugs by activating them or they form deactivated metabolites, which are excreted from the organism. The action of cytochromes P450 and peroxidases is shown on the metabolism of the drug ellipticine. Ellipticine has anticancer effects. The advantage of this drug is its low number of side-effects. The oxidation of ellipticine by cytochromes P450 and peroxidases leads to its metabolic activation or detoxification. Carbenium ions are generated by spontaneous cleavage of two active metabolites, 12-hydroxyellipticine and 13-hydroxyellipticine. Carbenium ions then form adducts with deoxyguanosine base in DNA. The ellipticine can also act as an inducer of cytochromes P450 in some tissues.

Key words

Cytochromes P450, peroxidases, drugs metabolism, ellipticine.

Obsah

Seznam použitých zkratk a značek.....	8
1 Cíl práce.....	10
2 Úvod	11
3 Cytochromy P450.....	12
3.1 Nomenklatura cytochromů P450.....	13
3.2 Mechanismus katalýzy cytochromů P450.....	14
3.3 Rozdělení lidských cytochromů P450.....	16
3.3.1 Rodina lidských CYP1.....	18
3.3.1.1 CYP1A1 a CYP1A2	18
3.3.1.2 CYP1B1.....	19
3.3.2 Rodina lidských CYP2.....	19
3.3.2.1 CYP2C9 a CYP2C19	19
3.3.2.2 CYP2D6	20
3.3.3 Rodina lidských CYP3.....	20
3.3.3.1 CYP3A4	21
3.4 Inhibice cytochromů P450	23
3.5 Regulační mechanismy exprese cytochromů P450.....	23
3.6 Polymorfismus cytochromů P450.....	24
4 Peroxidasy.....	25
4.1 Reakční cyklus peroxidasy.....	25
4.1.1 Oxidační stavy peroxidasy.....	26
4.1.2 Lidské hemové peroxidasy	27
4.1.2.1 Myeloperoxidasa	27
4.1.2.2 Eosinofilní peroxidasa.....	28
4.1.2.3 Laktoperoxidasa	28

4.1.2.4	Thyroidní peroxidasa.....	29
5	Enzymy metabolizující ellipticin, jejich exprese a modulace v lidském organismu	30
5.1	Ellipticin.....	30
5.1.1	Struktura ellipticinu	30
5.1.2	Mechanismy účinku ellipticinu.....	31
5.2	Enzymy metabolizující ellipticin	32
5.2.1	Oxidace ellipticinu katalyzovaná cytochromy P450	33
5.2.1.1	Tvorba kovalentních aduktů DNA s ellipticinem aktivovaným cytochromy P450	35
5.2.1.2	Účinek ellipticinu na expresi cytochromů P450.....	36
5.2.2	Oxidace ellipticinu katalyzovaná peroxidasami	37
5.2.2.1	Tvorba kovalentních aduktů DNA s ellipticinem aktivovaným peroxidasami.....	38
6	Závěr	40
	Seznam použité literatury	42

Seznam použitých zkratek a značek

AhR	receptor pro polycyklické aromatické uhlovodíky (z angl. „aryl hydrocarbon receptor“)
ARNT	AhR jaderný translokátor
ATP	adenosintrifosfát
cDNA	komplementární DNA
COX-1	ovčí cyklooxygenasa
COX-2	lidská cyklooxygenasa
CYP	cytochromy P450
DNA	deoxyribonukleová kyselina
EPO	eosinofilní peroxidasa
ER	endoplasmatické retikulum
FAD	flavinadenindinukleotid
FMN	flavinmononukleotid
FMO	monooxygenasa obsahující flavin
GIT	gastrointestinální trakt
HRP	křenová peroxidasa
HOX	halogenová oxokyselina
LPO	laktoperoxidasa
MAO	monoaminoxidasa
MFO	systém mikrosomálních monooxygenas se smíšenou funkcí (z angl. „mixed function oxidase“)
MPO	myeloperoxidasa
mRNA	messenger RNA (informační RNA)
NADPH	nikotinamidadenindinukleotidfosfát (redukovaný)
NAT	N-acetyltransferasa
PAH	polycyklické aromatické uhlovodíky
PCB	polychlorované bifenily
RH	substrát
ROH	odpovídající monooxygenační produkt
R'OOH	organický hydroperoxid
R'H a LO	odpovídající redukční produkty

TCDD	2,3,7,8-tetrachlorodibenzo- <i>p</i> -dioxin
TPO	thyroidní peroxidasa
UDP	uridindinukleotidfosfát
UGT	UDP glukuronyltransferasa
XOOH	peroxy sloučenina
HIV	„Human Immunodeficiency Virus“

1 Cíl práce

Cílem předkládané bakalářské práce bylo shromáždit poznatky o enzymech metabolizujících léčiva, a to se zaměřením zejména na cytochromy P450 a peroxidasy. Vedle základních informací, které se týkají těchto dvou skupin enzymů, bylo cílem práce rovněž popsání jejich efektivity v metabolismu protinádorového léčiva ellipticinu a v tvorbě kovalentních aduktů tohoto léčiva s DNA.

2 Úvod

Studium enzymů, které jsou schopné metabolizovat xenobiotika v lidském organismu, je zásadní problematikou, důležitou zejména z farmakologického hlediska. Tyto enzymy jsou schopné metabolizovat i většinu léčiv. V průběhu metabolismu léčiv totiž může docházet jak k potencování jeho farmakologického účinku, tak i ke snížení jeho vedlejších negativních účinků a vyloučení z organismu.

Mezi enzymy, které jsou pro metabolismus léčiv nejdůležitější, řadíme cytochromy P450. Na jejich studium se proto zaměřuje řada laboratoří po celém světě. Dalšími enzymy, které jsou schopné metabolizovat léčiva a jsou důležité i z farmakologického hlediska, jsou peroxidasy. V orgánech, v nichž není pro biotransformaci léčiv dostatek cytochromů P450, mohou jejich funkci nahradit právě peroxidasy. Jak cytochromy P450, tak i peroxidasy patří mezi enzymy účastnící se první fáze biotransformace xenobiotik, jejímž výsledkem mohou být jak detoxikační produkty, tak také aktivnější metabolity, než je původní xenobiotikum. Pozitivní aktivace xenobiotika na farmakologicky účinnější metabolit se využívá pro návrh nových léčiv. Naopak modulací reakcí vedoucích k negativní aktivaci (tvorbě toxických metabolitů léčiv) lze snížit jeho vedlejší účinky.

Působení cytochromů P450 a peroxidas v metabolismu léčiv je možné ukázat na metabolismu modelové sloučeniny ellipticinu, jednoho z léčiv vykazujících protinádorové účinky. Obě skupiny enzymů jsou schopné toto léčivo aktivovat na reaktivní metabolity, které tvoří adukty s DNA, jsou však schopné ho i metabolizovat na detoxikační metabolity, které jsou vyloučeny z organismu.

3 Cytochromy P450

Mikrosomální monooxygenasový systém, neboli systém oxidas se smíšenou funkcí (MFO z angl. „mixed function oxidases“) patří mezi nejvýznamnější enzymy metabolizující xenobiotika. MFO systém obsahuje enzymy, které se podílejí na katalýze mnoha chemických reakcí jako např. oxidačních, redukčních či oxygenačních reakcí.

Tento systém se skládá ze tří základních složek:

- **NADPH:cytochrom P450 reduktasa**, což je flavoproteinový enzym, jehož úkolem je dělit elektronové páry a dodávat tak postupně elektrony cytochromu P450
- **Cytochrom P450**, který patří mezi hemthiolátové enzymy
- **Membránové lipidy** jsou třetí, také velice důležitou složkou tohoto systému, umožňují totiž vyšší afinitu cytochromu P450 k hydrofobnímu substrátu, což je možné díky konformační změně cytochromu P450, kterou membránové lipidy způsobují.^{26,32}

Cytochromy P450, jež působí jako terminální oxidasa mikrosomálního monooxygenasového systému, sice spadají do skupiny hemoproteinů, ale díky specifickému uspořádání se svými vlastnostmi velice liší od ostatních zástupců této skupiny. Na rozdíl od ostatních hemoproteinů mají cytochromy P450 neobvyklé spektrum, absorbují totiž v redukovaném stavu **v komplexu s CO při 450 nm**, odtud tedy pochází číslo v jejich názvu, **P označuje pigment**. Ion železa je vázán čtyřmi vazbami k jednotlivým dusíkům hemu. Nad rovinou hemového kruhu, ale také pod ní je místo pro další dva ligandy. V cytochromech P450 působí jako pátý ligand thiolátový anion. Porfyrinový skelet (protoporfyrin IX) je v těchto hemoproteinech vázán jak hydrofobními silami, tak právě přes thiolátovou síru cysteinu přítomnou v aktivním centru enzymu. Atom kyslíku molekuly vody je šestým ligandem protoporfyrinu IX.^{32, 17}

Cytochromy P450 jsou enzymy, jejichž katalýzou probíhá většina reakcí I. fáze biotransformace cizorodých chemických látek (xenobiotik), ať už jsou to, jak již bylo řečeno, reakce oxidační, oxygenační nebo redukční. Výsledkem biotransformačních reakcí mohou být, buď detoxikované sloučeniny, popřípadě vede biotransformace k biologicky aktivnějším derivátům oproti původnímu substrátu. Biotransformací vzniklé detoxikované sloučeniny jsou mnohem polárnější než sloučenina původní, proto se poté

z těla snadněji vylučují a nedochází tak k bioakumulaci xenobiotika v těle. Biologicky aktivních látek se využívá při podávání léčiv, kdy může být biotransformací pozměněné léčivo do jeho aktivní formy mnohem účinnější než látka původní. Nicméně aktivnější mohou být také látky toxické, mutagenní či karcinogenní.²⁸

Předpokládá se, že cytochromy P450 jsou přítomné ve všech organismech žijících na zemi, čemuž odpovídá, že tyto enzymy byly nalezeny v archebakteriích, rostlinách a různých druzích živočichů. Většina cytochromů P450 byla objevena právě v různých živočišných organismech. Největší pozornost se však zaměřuje na lidské cytochromy P450. Různé enzymy z této skupiny, jejichž molekulová hmotnost se pohybuje okolo 50 000, se totiž podílejí na biosyntéze nízkomolekulárních sloučenin působících jako regulátory na různých úrovních procesů, které probíhají v lidském organismu. Cytochromy P450 se zapojují do metabolismu eikosanoidů a vitamínů rozpustných v tucích. Biosyntézou, na které se podílejí, vznikají tedy takové nízkomolekulární látky jako steroidy, prostaglandiny, tromboxany, deriváty mastných kyselin a deriváty kyseliny retinové.^{2,7,20,32}

V lidském genomu je kódováno 57 proteinů P450, z nichž se 15 zapojuje do metabolismu xenobiotik chemické povahy (např. léčiva, látky organismu cizí), 14 těchto proteinů se zapojuje do metabolismu sterolů, zahrnuje i metabolismus žlučových kyselin. Dále se některé cytochromy P450 podílejí na oxidaci vitamínů rozpustných v tucích a 9 proteinů se účastní metabolismu mastných kyselin a eikosanoidů. Pro zbývajících 15 proteinů P450 z 57 kódovaných v lidském těle jsou substráty v podstatě neznámé.⁷

Obsah cytochromů P450 v různých lidských tkáních závisí na mnoha odlišných faktorech jako je vliv vnějších podmínek, genetický polymorfismus, výživa, věk, kouření, konzumace alkoholu a působení léčiv.²⁸

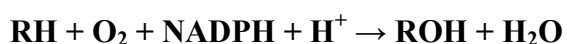
3.1 Nomenklatura cytochromů P450

Od roku 1991 je pro cytochromy P450 zavedena nová nomenklatura, podle níž jsou jednotlivé cytochromy P450 rozděleny do rodin a podrodin podle homologie jejich primární struktury - aminokyselinové sekvence. Dnes již běžně používané označení pro tyto enzymy má následující tvar: po zkratce CYP, která označuje právě cytochromy P450,

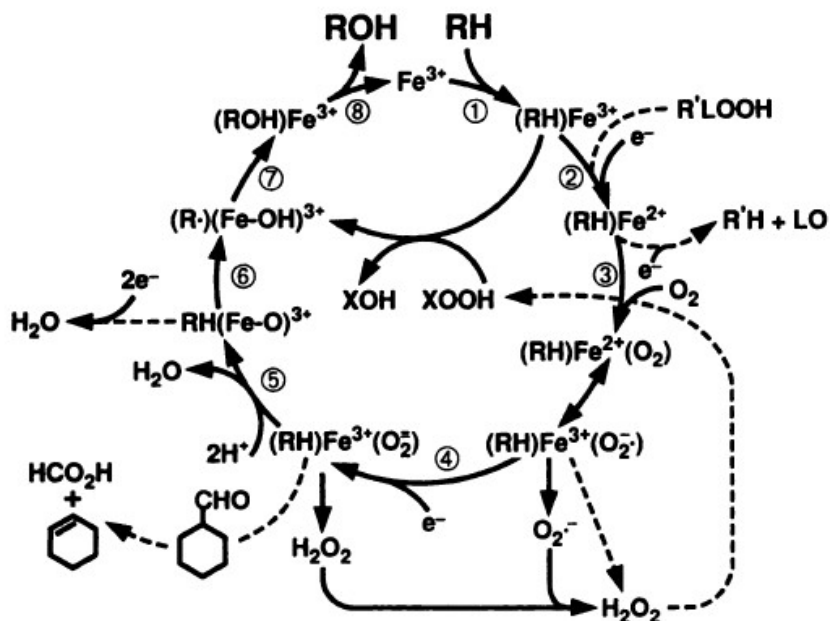
následuje arabská číslice značící rodinu. Do stejné rodiny patří enzymy se shodnou sekvencí alespoň ze 40 %. Rodiny se dělí dále na podrodiny, ty se označují velkým písmenem. Do stejné podrodiny patří enzymy s homologií minimálně 55 %² nebo 60 %²⁸, zde se čísla liší podle autorů. Jednotlivé členy podrodiny značíme opět arabským číslem. Výsledné označení konkrétního cytochromu P450 vypadá například takto CYP3A4, což je enzym s nejvyšším výskytem v játrech, kde se podílí na metabolismu léčiv. Označení genu pro konkrétní enzym se píše kurzívou, tedy *CYP3A4* je gen pro enzym CYP3A4.^{2,28}

3.2 Mechanismus katalýzy cytochromů P450

Společně s cytochromy P450 působí ještě další enzymy, např. NADPH:cytochrom P450 reduktasa, která se nachází v endoplasmatickém retikulu, nebo také mitochondriální enzymy. Většina reakcí katalyzovaných cytochromy P450 probíhá podle následující rovnice: (převzato z ²⁸)



Jednotlivé kroky zapojené v redukci molekulárního kyslíku katalyzované cytochromy P450 se začleněním jednoho atomu kyslíku do substrátu RH, dává odpovídající produkt ROH (obr. 1, str. 15).



Obr. 1: Reakční cyklus cytochromu P450, převzato z ⁵

RH – substrát, ROH – odpovídající monooxygenační produkt, R'LOOH – organický hydroperoxid, R'H a LO – odpovídající redukční produkty, XO2H – peroxy sloučeniny (alternativní donor kyslíku), Fe – atom hemového železa enzymu²⁸

V první reakci reakčního cyklu se substrát naváže na ferri formu cytochromu P450, tím se změní konformace molekuly enzymu. Ion železa v hemu, který byl v klidovém stavu hexakoordinován se během první reakce dostává do stavu pentakoordinovaného. Ve druhé reakci dochází k přenosu elektronu z NADPH:cytochrom P450 reduktasy, ferri forma cytochromu P450 se redukuje na ferro formu železa. Poté dochází k navázání biatomické molekuly kyslíku na železnatý ion v enzymu. Vytvoří se tak ternární komplex cytochrom P450 – O₂ – substrát, což odpovídá třetí reakci cyklu. Tento komplex poté přejde do jiného mezomerního stavu na ferri-superoxidový komplex, který je dále redukován NADPH:cytochrom P450 reduktasou na ferro-superoxidový komplex. Tato reakce je poslední částí tzv. aktivační fáze reakčního cyklu cytochromu P450. V následující, páté reakci dochází ke štěpení biatomické molekuly kyslíku, kdy je jeden atom kyslíku redukován na vodu a druhý zůstává vázaný na iontu železa ve formě ferrioxenového komplexu. Během šesté reakce dojde k odštěpení vodíkového atomu z molekuly substrátu, čímž vznikne radikál substrátu a hydroxylový radikál vázaný na hemový ion železa. Reakcí radikálů dojde k uvolnění hydroxylované molekuly substrátu a regeneraci nativní formy cytochromu P450.^{5,11}

Mezi monooxygenasy se smíšenou funkcí patří cytochromy P450 právě proto, že jsou schopny zabudovat 1 atom molekulárního kyslíku do substrátu a druhý do molekuly vody, tím se jejich funkce liší od dioxygenas, které inkorporují oba atomy molekuly kyslíku do substrátu.¹⁷

Existují dva odlišné způsoby přenosu elektronů na cytochromy P450, záleží při tom na umístění enzymů v buňce. Cytochromy P450 patří mezi proteiny vázané v membráně, mohou se nacházet v membráně endoplasmatického retikula (ER), popřípadě ve vnitřní mitochondriální membráně. Jestliže je cytochrom P450 vázán v membráně ER, donorem elektronů pro něho bude NADPH:cytochrom P450 reduktasa. Patří také mezi membránově vázané proteiny, N – konec prostupuje membránou endoplasmatického retikula. Převážná část tohoto proteinu se nachází na cytosolové straně membrány ER. Jedná se o protein, který se skládá ze dvou domén, z nichž každá obsahuje jeden flavin. Přenos elektronů začíná tím, že se dva elektrony získané z NADPH přesouvají z FAD na FMN a poté na hemové železo cytochromu P450.¹⁷

V mitochondriích je však přenos elektronů o něco delší. Ferredoxin je donorem elektronů do cytochromů P450 v mitochondriích. Ferredoxin obsahuje namísto flavinu skupinu Fe – S, nicméně ferredoxin je redukován ferredoxinreduktasou, která už flavin obsahuje. Elektrony, jejichž zdrojem je opět NADPH, se přenášejí z ferredoxinreduktasy na ferredoxin a poté na cytochrom P450. Několik cytochromů P450 může také přijmout elektrony z cytochromu b₅. Cytochrom b₅ je malý protein obsahující hemovou skupinu, který je také vázán v membráně.¹⁷

Cytochromy P450, které se podílejí na biotransformaci xenobiotik, mají širokou škálu specifických substrátů, hydroxylují celou řadu organických sloučenin. Existují však také cytochromy P450, jejichž substrátová specifita je velice úzká a hydroxylují tedy jen malé množství substrátů. Takovéto enzymy metabolizují endogenní sloučeniny, které se nacházejí v eukaryotických buňkách.³²

3.3 Rozdělení lidských cytochromů P450

Lidské cytochromy P450 mají 18 genových rodin, jež se dále rozděluje do 44 podrodin. Sekvenovaných je 57 genů lidských cytochromů P450 a 58 pseudogenů. Pseudogeny jsou neúplné geny, které neprodukují funkční proteiny.¹⁷ Rozdělení lidských CYP enzymů je uvedeno v tabulce 1 (str. 17).

Tab. 1: Přehled cytochromů P450 v lidském organismu, převzato z ¹⁷

CYP	počet podrodin	Funkce, reakce
CYP1	3	Metabolismus léčiv
CYP2	13	Metabolismus léčiv a steroidů
CYP3	1	Metabolismus léčiv
CYP4	6	Metabolismus mastných kyselin a kys. arachidonové
CYP5	1	Syntéza tromboxanu A ₂
CYP7A	1 člen podrodiny	Biosyntéza žlučových kyselin
CYP7B	1 člen podrodiny	Specifická 7-alfa hydroxylasa
CYP8A	1 člen podrodiny	Syntéza prostacyklinů
CYP8B	1 člen podrodiny	Biosyntéza žlučových kyselin
CYP11	2	Biosyntéza steroidů
CYP17	1	Biosyntéza steroidů
CYP19	1	Biosyntéza steroidů
CYP20	1	Neznámá funkce
CYP21	1	Biosyntéza steroidů
CYP24	1	Degradace vitamínu D
CYP26A	1 člen podrodiny	Hydroxylasa kyseliny retinové
CYP26B	1 člen podrodiny	Hydroxylasa kyseliny retinové
CYP26C	1 člen podrodiny	Hydroxylasa kyseliny retinové
CYP27A	1 člen podrodiny	Biosyntéza žlučových kyselin
CYP27B	1 člen podrodiny	Vitamin D3 1-alfa hydroxylasa
CYP27C	1 člen podrodiny	Neznámá funkce
CYP39	1	7-alfa hydroxylace 24-hydroxycholesterolu
CYP46	1	Cholesterol 24-hydroxylasa
CYP51	1	Biosyntéza cholesterolu

Jak je vidět v tabulce 1, mezi enzymy schopné metabolizovat léčiva patří hlavně 3 rodiny cytochromů P450, a to CYP1, CYP2 a CYP3. Proto se práce dále zaměřuje převážně na tyto rodiny enzymů. Nejvíce těchto enzymů se nachází v játrech, ale v menší míře se vyskytují i v několika dalších důležitých tkáních, jako jsou například ledviny, plíce, srdce, mozek, GIT, kůže nebo také v placentě. Nelze říci, který z enzymů je nejdůležitější, protože každý má svou specifickou významnou úlohu v metabolismu

cizorodých látek. Nicméně z hlediska kvantity by bylo možné za nejvýznamnější enzym určit CYP3A4, nachází se sice v mnoha tkáních, ale jeho hlavní výskyt je v játrech.²⁸

Velmi důležité jsou následující isoformy cytochromů P450, a to CYP3A4, CYP2D6, CYP2C9, CYP2C19, CYP2E1 a CYP1A2, jsou totiž zodpovědné za oxidační metabolismus více než 90 % prodáváných léčiv.³⁸

3.3.1 Rodina lidských CYP1

Enzymy patřící do rodiny CYP1 hydroxylují kromě xenobiotik též estrogen a oxidují i uroporfyrinogen na uroporfyrin v metabolismu hemu. Cytochromy P450 této rodiny jsou často indukovány polycyklickými uhlovodíky, z nichž se některé nachází v cigaretovém kouři nebo připáleném jídle. Jedním z důvodů, proč jsou tyto enzymy zajímavé, je jejich schopnost aktivovat sloučeniny, a tím vytvořit reaktivní formy karcinogenů.¹⁷

3.3.1.1 CYP1A1 a CYP1A2

Tyto dva enzymy hrají nejvýznamnější roli v aktivaci prokarcinogenů. Jsou si velice podobné na úrovni aminokyselinové sekvence, katalyzují také podobné reakce, jejichž výsledkem může být aktivace až 90 % známých karcinogenů. Nicméně se liší v lokalizaci.²⁸

CYP1A1 se vyskytuje v různých tkáních, nejméně je však zastoupen v játrech. Patří mezi enzymy, jež jsou silně indukovány u kuřáků. Mezi induktory tohoto enzymu můžeme zahrnout 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD), benzo(a)pyren, kouření, omeprazol. Jako substráty potom mohou působit polycyklické aromatické uhlovodíky (PAH), tamoxifen nebo aflatoxin B1.²⁸ Exprese CYP1A1 je regulována řadou proteinů, které vykazují genetický polymorfismus a tvrdí se, že dědičná variabilita přispívá k individuální citlivosti na chemické látky životního prostředí.¹⁰

CYP1A2 na rozdíl od CYP1A1 patří mezi typické jaterní enzymy. Jeho široká substrátová specifita zahrnuje substráty, jako jsou aromatické aminy, heterocyklické aminy, které jsou i produkty tepelně upravených potravin, dále pak benzo(a)pyren nebo aflatoxin B1. CYP1A2 je indukován podobně jako předchozí enzym TCDD, benzo(a)pyrenem, heterocyklickými aminy nebo polychlorovanými bifenyly (PCB). CYP1A2 patří mezi enzymy metabolizující steroidy.²⁸ Mezi léčiva metabolizovaná přednostně tímto enzymem zahrnujeme acetaminofen, clozapine, phenacetin. U cytochromu P450 1A2 je známý genetický polymorfismus.²

3.3.1.2 CYP1B1

CYP1B1 je jediným zástupcem podrodiny 1B. Patří mezi inducibilní enzymy, nachází se v játrech, ale i v jiných tkáních jako jsou ledviny, kůže, prostata, děloha nebo lidský plod. Množství tohoto enzymu v lidském organismu může ovlivnit vnější prostředí.²⁸ Gen enzymu CYP1B1 byl spojen s primárním vrozeným zeleným očním zákalem (glaukom). U savců není substrát tohoto enzymu prozatím známý, nicméně se spekuluje o tom, že tento cytochrom P450 je potřebný pro eliminaci signální molekuly. Defekty v tomto genu mohou vést k chronickému zvýšení hladiny koncentrace signálních molekul, což může mít za následek zelený oční zákal. Zasaženou molekulou může být steroid.¹⁷ CYP1B1 má vysokou afinitu ke karcinogenům inhalovaným v tabákovém kouři dále pak k 17 β -estradiolu.²⁵

3.3.2 Rodina lidských CYP2

V tabulce 1 (str. 17) můžeme vidět, že nejobsáhlejší rodinou lidských cytochromů P450 je rodina 2, do níž spadá 13 podrodin. 28 % všech lidských CYP enzymů patří právě do této rodiny. Mnoho z těchto proteinů umí hydroxylovat steroidy, některé z nich jsou exprimovány u obou pohlaví specifickým způsobem. Dále se také některé tyto enzymy zapojují do metabolismu léčiv, chrání nás například proti toxinům v potravě.¹⁷

3.3.2.1 CYP2C9 a CYP2C19

Podrodina cytochromů P450 2C zahrnuje 4 hlavní členy: 2C8, 2C9, 2C10 a 2C19. CYP2C9 a 2C19 hrají důležitou roli v metabolismu léčiv a jejich polymorfismus je dobře známý. Jsou objeveny tři chybné alely CYP2C9 genu, z nichž 2 způsobují pokles aktivity tohoto enzymu.²

Komplementární DNA (cDNA) **CYP2C9** kóduje protein složený ze 490 aminokyselin. CYP2C9 se řadí k enzymům, které jsou exprimovány v játrech konstitutivně.¹⁵ CYP2C9 se zapojuje do metabolismu důležitých léčiv jako je phenytoin, S-warfarin, tolbutamid, losartan a další. Jedná se o enzym, který hraje roli v metabolismu benzo(a)pyrenu. V řadě prací bylo postulováno, že genetický polymorfismus tohoto enzymu může ovlivňovat individuální vnímavost člověka na rakovinu plic.²³ Významný je polymorfismus enzymu CYP2C9 pro léčbu, během které se využívají nesteroidní protizánětlivé léky. Nejméně 16 různých registrovaných nesteroidních léčiv s protizánětlivými účinky je alespoň částečně metabolizováno CYP2C9. Mezi ně můžeme zařadit například kyselinu acetylsalicylovou, indomethacin nebo ibuprofen.¹⁴ Mnoho

substrátů z řad léčiv je slabě kyselých s hodnotou pKa v rozsahu 3,8 – 8,1, ale CYP2C9 má také schopnost metabolizovat neutrální, vysoce lipofilní xenobiotika. Některé barbituráty mohou indukovat aktivitu CYP2C9.¹⁵

CYP2C19 je vysoce polymorfní enzym s 3 % pomalých metabolizérů přítomných v kavkazské populaci, ale téměř 20 % v asijské populaci. Substráty tohoto enzymu bývají neutrální, popřípadě slabě bazické a mírně lipofilní, dále by měly být schopny tvořit vodíkové můstky s odpovídajícími částmi proteinu.²

3.3.2.2 CYP2D6

Gen *CYP2D6* je lokalizovaný na chromosomu 22q13.1. Vzniklý enzym potom tvoří polypeptidový řetěz složený ze 497 aminokyselin.¹³ **CYP2D6** se řadí mezi konstitutivní enzymy s výskytem v játrech a gastrointestinálním traktu (GIT). Jedná se o enzym, u něhož se vyskytuje významný genetický polymorfismus. Právě polymorfismus způsobuje přítomnost 3 hlavních fenotypů tohoto enzymu, jež se zapojují do metabolismu léčiv. Tyto 3 fenotypy se klasifikují jako pomalý metabolizér (defektivní alely CYP2D6), rychlý metabolizér a ultrarychlý metabolizér. Množství v lidském organismu ovlivňují léčiva a právě genetický polymorfismus. Mezi substráty tohoto enzymu z řad léčiv patří například kodein, fluvoxamin a trimepranol. Typickými substráty jsou antidepresiva a β -blokátory.^{2,28} Mnoho jeho substrátů má povahu lipofilních bází s protonovaným atomem dusíku. Ačkoli jeho procentuální zastoupení v lidském organismu není příliš vysoké, jeho role v metabolismu léčiv je velmi významná. CYP2D6 katalyzuje oxidační biotransformaci okolo 25 % klinicky důležitých léčiv. Gen tohoto enzymu je vysoce polymorfní s více než 70 odlišnými alelami.⁴ Genetický polymorfismus tohoto enzymu významně ovlivňuje farmakokinetiku okolo 50 % klinicky používaných léčiv, které jsou substráty CYP2D6. Důsledky polymorfismu u dávek běžných léků mohou vést k nežádoucím účinkům nebo léky nevyvolají žádnou odpověď organismu.¹³

3.3.3 Rodina lidských CYP3

Rodina cytochromů P450 3 má pouze jednu podrodinu, a to CYP3A. V lidském organismu jsou enzymy patřící do této podrodiny jedny z nejdůležitějších enzymů, jež se zapojují do metabolismu léčiv.¹⁷

3.3.3.1 CYP3A4

CYP3A4 (obr. 2) je nejhojněji exprimovaným cytochromem P450 v lidských játrech, kde metabolizuje více než 120 různých léčiv,¹⁷ což je více molekul léků, než jsou schopny metabolizovat všechny ostatní isoformy.³⁸ Kromě jater se nachází také například v ledvinách, GIT nebo v děloze. Podílí se nejen na oxidaci xenobiotik, ale také endogenních látek (steroidy). CYP3A4 je indukován rifampicinem, barbituráty, erythromycinem, nebo dexamethasonem. Díky jeho široké substrátové specifitě je pro tento enzym substrátem řada léčiv jako acetaminofen, kodein, tamoxifen nebo erythromycin, který může sloužit i jako induktor. Enzym CYP3A4 metabolizuje také řadu karcinogenů. Z tohoto hlediska patří mezi substráty aflatoxiny, PAH, aromatické aminy a endogenní steroidní sloučeniny. Množství tohoto enzymu v lidském organismu ovlivňuje kouření, léčiva a vnější prostředí.^{2,28}

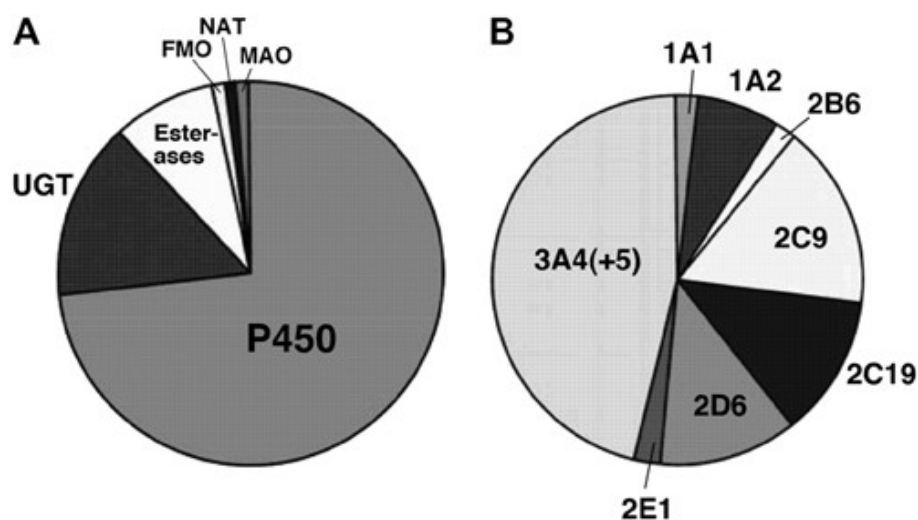


Obr. 2: Struktura CYP3A4, převzato z²⁸

Tmavě modrá značí N-konec, červená C-konec proteinu. Hem je zobrazen ve středu molekuly lemovaný helixem I. Helix A^o, který není součástí struktur ostatních cytochromů P450, je znázorněn v levém horním rohu této struktury. F helix se nachází vpravo od hemu.

Porovnání, jakou úlohu mají cytochromy P450 mezi ostatními enzymy, jež se účastní bioaktivace, ukazuje obrázek 3. V části A obrázku 3 je znázorněné zastoupení skupin enzymů, které se podílejí na biotransformaci xenobiotik. Cytochromy P450 se do bioaktivačních procesů zapojují nejvíce, téměř 75 % léčiv metabolizují právě cytochromy P450. Důvodem takto velkého zastoupení je jejich široká substrátová specifita, celkově mají více substrátů než ostatní enzymy, alespoň tedy mezi léčivy. Do biotransformace látek se zapojují i další enzymy, např. UDP-glukuronosyltransferasa, monooxygenasy obsahující flavin, N-acetyltransferasy a monoaminoxidasy, část A obrázku 3.⁸

V části B obrázku 3 je vidět, jaké mají zastoupení v metabolismu léčiv jednotlivé cytochromy P450. Z tohoto obrázku je patrný největší podíl CYP3A4, to vyplývá i z toho, že je to nejvíce exprimovaný cytochrom P450 v lidských játrech. Rodina lidských CYP2 má také poměrně velké uplatnění v metabolismu léčiv, převážně jsou to CYP2B6, CYP2C9, CYP2C19 a CYP2D6. Do metabolismu léčiv se ale zapojují také CYP1A1, CYP1A2 a CYP2E1.



Obr. 3: Zastoupení enzymů v metabolismu léčiv, převzato z⁸

(A) Příspěvek jednotlivých enzymových systémů v metabolismu prodáváných léčiv.

(B) Příspěvek jednotlivých cytochromů P450 v metabolismu léčiv.

UGT představuje UDP-glukuronosyltransferasu, (UDP – uridindinukleotidfosfát), FMO – monooxygenasa obsahující flavin, NAT – N-acetyltransferasa, MAO – monoaminoxidasa, P450 – cytochrom P450

3.4 Inhibice cytochromů P450

Existuje mnoho faktorů ovlivňujících metabolismus léčiv, obvykle se klasifikují do skupiny genetických, negenetických a environmentálních faktorů. Expozice chemikáliím a polutantům životního prostředí může vést k indukci popřípadě inhibici metabolismu léčiv. Indukce se definuje jako zvýšení množství a aktivity enzymu, který se zapojuje do metabolismu léčiv. Naopak inhibice metabolismu léčiv obecně může znamenat akutní pokles metabolismu.²¹

Rovnováha mezi detoxikací xenobiotika a jeho aktivací v jednotlivých druzích nebo orgánech velmi závisí na relativním množství a účincích odlišných forem cytochromů P450, které jsou exprimovány. Inhibitory cytochromů P450 mohou být velice užitečné při objasňování katalytické specifity jednotlivých reakcí v různých CYP enzymech.⁹

Tři kroky v katalytickém cyklu cytochromů P450 jsou obzvláště citlivé vůči inhibici²⁰:

- a) navázání substrátu** – během první reakce cyklu
- b) navázání molekulárního kyslíku** následované prvním elektronovým přenosem – během třetí reakce
- c) katalytický krok, ve kterém se substrát skutečně oxiduje.**

Inhibitory těchto tří kroků lze mechanisticky rozdělit do následujících skupin²⁰:

- 1) Reverzibilně vázané inhibitory
- 2) Inhibitory tvořící „kvazi“ – ireverzibilní komplexy s atomem hemového železa
- 3) Inhibitory vážící se ireverzibilně na protein nebo hemovou složku nebo také zvyšují degradaci a oxidační fragmentaci hemové prosthetické skupiny.

3.5 Regulační mechanismy exprese cytochromů P450

Cytochromy P450 mají různé mechanismy genové regulace. Mnoho z těchto genů může být „zapnuto“ popřípadě vyvoláno nějakým chemickým signálem.¹⁷ Expresi cytochromů P450 je možné regulovat na třech úrovních. Mezi nejběžnější, nikoli však jediné regulační mechanismy exprese cytochromů P450, patří modulace transkripční aktivity genu. Transkripční a rozmanité posttranskripční mechanismy byly popsány na

expresi CYP2E1. K dalším regulacím vyskytujícím se na úrovni mRNA, méně častým než regulace transkripce, patří úprava mRNA a translace (tab. 2).⁵

Tab. 2: Regulační kroky exprese cytochromů P450, převzato z⁵

Regulační krok	Příklady CYP
Transkripce	1A1, 1A2, 2B1, 2B2, 2C7, 2C11, 2C12, 2D9, 2E1, 2H1, 2H2, 3A1/2, 3A6, 4A1, 11A1, 11B1, 17, 21A1
Úprava a stabilizace mRNA	1A1, 1A1, 2B1, 2B2, 2C12, 2E1, 2H1, 2H2, 3A1/2, 3A6, 11A1
Translace a enzymová stabilizace	2E1, 3A1/2, 3A6

3.6 Polymorfismus cytochromů P450

„Genetický polymorfismus je faktorem, kdy vrozené změny DNA vedou k absenci cytochromu P450, k nemožnosti indukce tohoto enzymu nebo i ke tvorbě formy cytochromu P450, která má změněnou katalytickou aktivitu.“ cit.²⁸ Právě genetický polymorfismus je jedním z nejdůležitějších faktorů přispívajících k variabilitě jednotlivých hladin cytochromů P450. Obecně lze říci, že alely způsobující buď vadnou, kvalitativně pozmeněnou, sníženou anebo naopak zvýšenou aktivitu cytochromů P450, byly identifikovány pro mnoho těchto enzymů.² „Polymorfismus se definuje jako geneticky podmíněná odlišnost postihující alespoň 2 % uvažované populace.“ cit.²⁸ Je proto potřeba rozlišovat mezi vzácně se vyskytujícími mutacemi, jež způsobují onemocnění a polymorfismem, který se vyskytuje v takovémto poměrně rozsáhlém měřítku. Polymorfismus cytochromů P450 může ovlivňovat metabolismus léčiv, a tím náchylnost k nemocem, aniž by nemoc přímo způsobil. Zjistilo se, že existují značné rozdíly v genetickém polymorfismu mezi různými lidskými rasami a populacemi.¹⁶

Přibližně 40 % metabolismu léčiv, zprostředkovaného lidskými cytochromy P450, se uskuteční polymorfními formami těchto enzymů, které způsobí kvantitativní nebo kvalitativní změny v metabolismu léčiv.¹²

4 Peroxidas

Vedle systému mikrosomálních monooxygenas se na metabolismu xenobiotik, tedy i léčiv, podílejí i další enzymy, například peroxidas. Peroxidas (EC 1.11.1.7) patří do skupiny enzymů, jež jsou schopné redukovat peroxid vodíku za současné oxidace buď endogenní sloučeniny, nebo xenobiotika. Právě schopnost detoxikovat peroxid vodíku je společná pro všechny peroxidas. Podobně jako pro MFO systém obsahující cytochrom P450 platí i pro peroxidas široká substrátová specifita, kdy mohou jako substráty vystupovat buď látky organické (fenoly a aromatické aminy), nebo také anorganické.^{11,26,32}

Peroxidas se většinou řadí mezi hemoglykoproteiny s prosthetickou skupinou tvořenou obvykle ferriprotoporfyrinem IX. V tomto uspořádání je železo v oxidačním čísle +III pentakoordinované a pátý ligand tohoto systému tvoří dusík histidylového zbytku proteinové části enzymu.^{11,26,32} Šestá koordinační pozice na distální straně hemu je v nativní formě enzymu volná.¹⁸ Znamé jsou také peroxidas, jejichž porfyrinový skelet je pozmeněný, existují však i peroxidas bez porfyrinového skeletu. V takových peroxidasách se objevují např. ionty manganu (Mn^{2+}) nebo vanadu (V^{5+}).^{11,32}

Peroxidas lze rozdělit do následujících tří skupin, a to podle charakteru jejich aktivního místa:

1. Hemové peroxidas – nejpočetnější skupina
2. Vanadové peroxidas
3. Ostatní peroxidas.

Nejpočetnější skupinu peroxidas, jež mají v aktivním centru hem, lze ještě dále rozdělit do dvou superrodin, a to na základě sekvenční homologie. Do první superrodiny se řadí hemové peroxidas hub, rostlin a bakterií, do druhé potom živočišné hemové peroxidas.²⁶

4.1 Reakční cyklus peroxidas

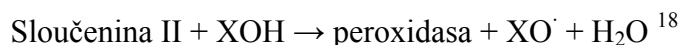
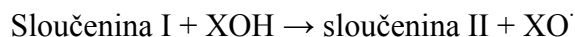
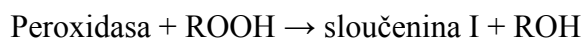
Peroxidas jsou pro tělo životně důležité, zejména pro jeho obranný systém a hormonální syntézy. Několik peroxidas, které se nacházejí v savcích tkáních, je zapojeno do metabolické biotransformace xenobiotik.²⁷

4.1.1 Oxidační stavy peroxidas

Typicky se hemové peroxidasy vyskytují v několika oxidačních stavech, ty jsou pro ně charakteristické. Dosud bylo zjištěno a popsáno 8 různých oxidačních stavů peroxidas.

1. **Nativní peroxidasa** – tento klidový stav peroxidasy obsahuje hemové železo ve ferri formě (Fe^{3+})
2. **Redukovaná forma** – zde se vyskytuje hemové železo ve ferro formě (Fe^{2+})
3. **Sloučenina I** – vzniká reakcí peroxidasy, jejíž železo je ve ferri formě, s peroxidem vodíku, sloučenina I je tak o 2 oxidační ekvivalenty vyšší než nativní forma enzymu, tato sloučenina má charakteristickou zelenou barvu
4. **Sloučenina ES** – tvorba tohoto intermediátu probíhá podobně jako u předchozího, nicméně se vytváří pouze v některých peroxidasách, barva tohoto intermediátu je typicky červená
5. **Sloučenina II** – tato sloučenina vzniká redukcí jednoho elektronu sloučeniny I nebo sloučeniny ES
6. **Sloučenina III** – vzniká reakcí nativního enzymu se superoxidovým anion radikálem (O_2^-), ale také může vzniknout reakcí redukované formy peroxidasy s molekulou kyslíku
7. **Sloučenina X** – tato sloučenina vzniká při reakci nativní formy peroxidasy s chloritanem (ClO_2^-)
8. **Sloučenina EOX** – tato sloučenina vznikne během reakce halogenidů se sloučeninou I^{6,11}

Z většiny těchto vyjmenovaných oxidačních stavů peroxidas je sestaven jejich reakční cyklus. V následujícím cyklu reakcí, jsou ukázány reakce, které se zapojují do oxidace xenobiotik:



V peroxidasovém cyklu je sloučenina I redukována ve dvou po sobě jdoucích jednoelektronových krocích prostřednictvím sloučeniny II. Během těchto jednoelektronových oxidačních reakcí se mnoho substrátů oxiduje na odpovídající radikály.⁶

4.1.2 Lidské hemové peroxidasy

Lidský organismus obsahuje několik rodin hemových peroxidas, rodiny těchto enzymů jsou shrnuty v tabulce 3.

Tab. 3: Shrnutí rodin lidských peroxidas, převzato z¹⁸

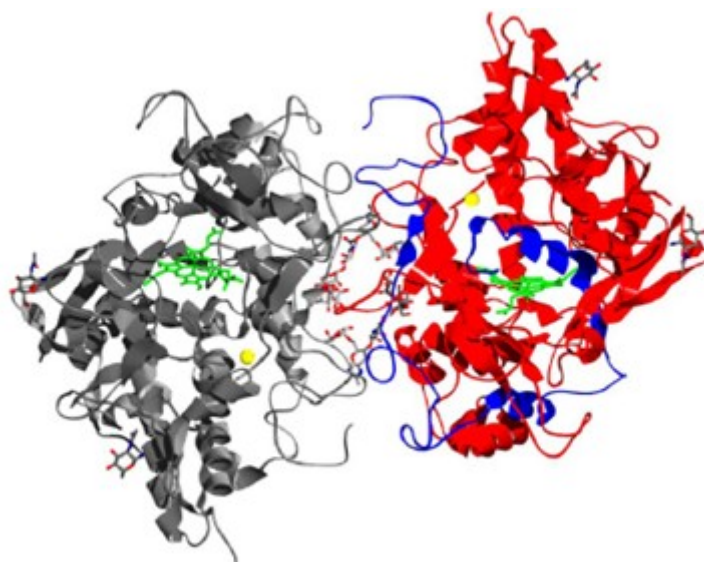
Rodina peroxidas	zkratka	Buňka obsahující peroxidasu	Homologie s MPO
Myeloperoxidasa	MPO	Neutrofily, leukocyty	100 %
Eosinofilní peroxidasa	EPO	eosinofily	70 %
Laktoperoxidasa	LPO	Prsní epitelální buňky	61 %
Thyroidní peroxidasa	TPO	thyreocyty	47 %

Myeloperoxidasa, laktoperoxidasa a eosinofilní peroxidasa jsou zakódovány v jednotlivých genech lidského chromosomu 17. Tyto geny mají velmi podobnou strukturu intronů – exonů. Na rozdíl od těchto skupin peroxidas je thyroidní peroxidasa umístěná na chromosomu 2, její odlišná intron – exon struktura navíc naznačuje, že se gen pro TPO vyvinul nezávisle na třech dalších genech peroxidas.⁶

4.1.2.1 Myeloperoxidasa

Neutrofilní myeloperoxidasa katalyzuje oxidaci halogenidů peroxidem vodíku za produkce HOX – halogenových oxokyselin. Xenobiotika nebo jejich metabolity, které se akumulují v plasmě nebo kostní dřeni, mohou být také oxidované nebo chlorované za pomoci aktivovaných leukocytů. Druhotná akutní myeloidní leukemie po chemoterapii s etoposidem (inhibitor topoisomerasy) nebo leukemie indukovaná chronickou expozicí benzenu byly připsány radikálům tvořeným z metabolitů benzenu, které modifikují DNA. Ty vznikají metabolismem z etoposidu nebo fenolu, respektive MPO/H₂O₂.¹⁸

Myeloperoxidasa je uspořádaná jako homodimer, každá polovina dimeru obsahuje atom železa přítomný jako kovalentně vázaný hem, dále pak ještě atom vápníku.⁶ (Obr. 4, str. 28)



Obr. 4: Struktura homodimeru lidské myeloperoxidasy, převzato z⁶

4.1.2.2 Eosinofilní peroxidasa

EPO se nachází v cytoplasmatických granulách lidských eosinofilních leukocytů, jsou mnohem méně aktivní v oxidaci chloridových aniontů než MPO, naopak v oxidaci BR^- , I^- a SCN^- jsou oproti MPO aktivnější. EPO hraje hlavní roli v obraně proti parazitům, produkují totiž reaktivní kyslíkové radikály, které jsou vůči parazitům, houbám a bakteriím cytotoxické. Eosinofilní peroxidasa je vysoce kationtový protein, což umožňuje její snadné přilnutí k povrchu buněk. Výsledkem je poté vytvoření např. hydroxylových radikálů v těsné blízkosti membrány patogenu. Rozsáhlá degranulace eosinofilů a depozice EPO se vyskytuje v některých patologických podmínkách, které se objevují při některých nemocech jako Hodgkinsova choroba nebo chronická myeloidní leukemie.¹⁸

4.1.2.3 Laktoperoxidasa

Laktoperoxidasa a slinná peroxidasa poskytují antibakteriální systém mléku a slinám, přispívají také laktoferin a lysozym. Tyto enzymy jsou syntetizovány a vylučovány duktálními epitelálními buňkami mléčné žlázy a jinými exokrinními žlázami. Slzy, sekretované slznými žlázami, obsahují peroxidasu imunologicky podobnou LPO. Tyto peroxidasy pravděpodobně zajišťují ochranu před mikrobiálními infekcemi sliznic oka, nosu, úst, tracheobronchiálního stromu a střevního traktu.¹⁸

4.1.2.4 Thyroidní peroxidasa

Různá environmentální xenobiotika způsobují zvětšení štítné žlázy (struma). Mechanismus lze pravděpodobně připsat jejich kooxidaci se sloučeninou I nebo II TPO, kdy se tvoří reaktivní meziprodukty, které se kovalentně váží na aminokyselinové zbytky, které určují peroxidasovou aktivitu. Inaktivace TPO způsobuje stimulaci hladin hormonů štítné žlázy, jež ovlivňují syntézu TPO a NADPH oxidasy. Výsledný prodloužený růstový stimul vybírá proliferální nebo transformované buňky štítné žlázy a zvyšuje riziko rakoviny štítné žlázy.¹⁸

5 Enzymy metabolizující ellipticin, jejich exprese a modulace v lidském organismu

5.1 Ellipticin

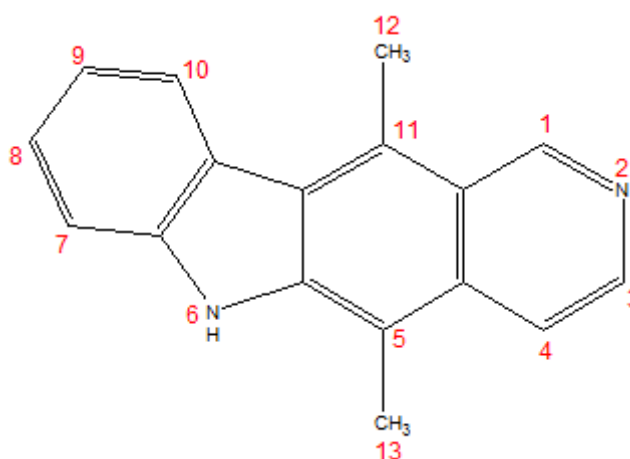
Ellipticin, jež se systematicky nazývá 5,11-dimethyl-6*H*-pyrido[4,3-*b*]karbazol, je alkaloid izolovaný z rostlin čeledi *Apocyanaceae*, kam patří například rostliny *Ochrosia borbonica* nebo *Excavatia coccinea*. Tento rostlinný alkaloid a jeho některé deriváty vykazují prokazatelnou a významnou protinádorovou aktivitu, jsou aktivní i proti HIV. Patří tedy mezi protinádorová léčiva. Hlavním důvodem zájmu o ellipticin a jeho rozpustné deriváty pro klinické účely je jejich vysoká účinnost proti různým druhům rakoviny.^{33,35} Klinické zkoušky ukázaly, že právě tento alkaloid a jeho deriváty působí proti takovým nádorovým buněčným liniím, jako jsou leukemie, lymfosarkomy, B16 melanom a buněčné linie rakoviny tlustého střeva SW480.³⁷ Další výhodou je poměrně malý výskyt vedlejších toxických účinků.^{33,35} Nicméně ellipticin patří také mezi potenciální mutageny. Existuje několik mechanismů protinádorového účinku ellipticinu s nespecifickým působením, dva z nich jsou však nejběžnější. Mezi převládající mechanismy protinádorové, mutagenní a cytotoxické aktivity ellipticinu patří jeho interkalace mezi páry bází dvojšroubovicové struktury DNA nebo působí jako inhibitor aktivity topoisomerasy II. Nespecifické působení ellipticinu znamená, že působí se stejným účinkem jak na buňky nádorové, tak i na buňky zdravé.^{3,26,36}

Ellipticin je jedním z nejjednodušších alkaloidů s planární strukturou vyskytujících se v přírodě. Poprvé byla tato látka izolována v roce 1959 z listů stále zeleného stromu *Ochrosia elliptica*, který roste divoce v Oceánii.³⁵

5.1.1 Struktura ellipticinu

Základní struktura ellipticinu i jeho derivátů je tvořena karbazolovou částí spojenou s pyridinovým kruhem, což dává celkový vzhled velmi aromatické hydrofobní sloučeniny. Informace o struktuře ellipticinu popřípadě jeho derivátů jsou důležité pro farmakologické účely.³ Potenciální pozice v molekule ellipticinu (obr. 5, str. 31) vhodné k modifikaci pro přípravu dalších, potenciálně farmakologicky účinných derivátů, jsou následující:

1. Hydroxylace v pozici 9 a 7
2. Kvarterizace dusíku v pozici 2 (pyridinový dusík) přidáním methylové skupiny nebo alifatického hydrofobního řetězce
3. Přidání methylové skupiny nebo alifatických řetězců na pozici N-6 nebo C-1
4. Posunutí methylové skupiny z pozice C-11 na pozici C-1
5. Cyklizace na pozicích C-10 a hydroxy-9 v přítomnosti primárních aminů, vedoucí k řadě oxazolopyridokarbazolů.³



Obr. 5: Struktura ellipticinu, upraveno podle³⁷

5.1.2 Mechanismy účinku ellipticinu

Jak již bylo uvedeno výše, účinky tohoto protinádorového léčiva jsou postaveny na nespecifickém působení. To se však příliš neslučuje s jeho poměrně úzkou specifitou aktivity vůči nádorovým onemocněním. Specificky působí pouze na určité typy neoplasie.^{26,30}

Možné mechanismy působení protinádorového léčiva ellipticinu:

Interkalace ellipticinu do dvojšroubovicové struktury DNA - ellipticinový chromofor se tvarem i velikostí velice podobá purin-pyrimidinovým komplementárním bázím. Tím poskytuje příznivé podmínky pro jeho interkalaci do dvojšroubovicové struktury DNA. Navíc také může polycyklický aromatický charakter této molekuly vytvořit těsné interakce s hydrofobními částmi molekuly DNA, tato místa však musí být vhodně přizpůsobena.^{3,35}

Inhibice topoisomerasy II – ellipticin inhibuje aktivitu topoisomerasy II, čímž zprostředkovaně rozštěpí DNA. Vytvoření ternárního komplexu mezi topoisomerasou II, DNA a ellipticinem je pravděpodobně kritické pro poškození DNA a následnou buněčnou smrt. Předpokládá se, že topoisomerasa II je primárním buněčným cílem tohoto léčiva.³⁵

Selektivní inhibice fosforylace proteinu p53 - ellipticin a 9-hydroxyellipticin způsobují selektivní inhibici fosforylace proteinu p53, produktu tumor supresorového genu. Protein p53 je fosforylován specifickou cyklin-dependentní-kinasou. Právě inhibice této cyklin-dependentní kinasy pravděpodobně způsobí inhibici fosforylace proteinu p53.¹⁹ „Nahromadění defosforylovaného proteinu p53 pak může vést až k indukci apoptosy.“ cit.³⁰

Inhibice oxidační fosforylace – inhibice, která vede k drastickému snížení ATP v buňkách, a tím navodí jejich apoptosu.^{24,26}

Inhibice telomerasy.³

Kovalentní vazba ellipticinu na DNA – nový možný mechanismus účinku tohoto léčiva, hovoří se o něm v následující kapitole 5.2.

Jak již bylo uvedeno, společným znakem pro všechny zde zmíněné mechanismy účinku je nespecifické působení ellipticinu. Při terapii, která využívá ellipticin, hraje velmi důležitou roli také různorodost v odpovědích pacientů na podané léčivo. Účinek ellipticinu závisí na enzymové výbavě daného pacienta, zda se jeho enzymy podílejí na metabolismu ellipticinu. Z hlediska enzymové výbavy pacientů je tedy účinek ellipticinu pro jednotlivé pacienty specifický. Což může být vysvětlením specifického působení ellipticinu.³⁰

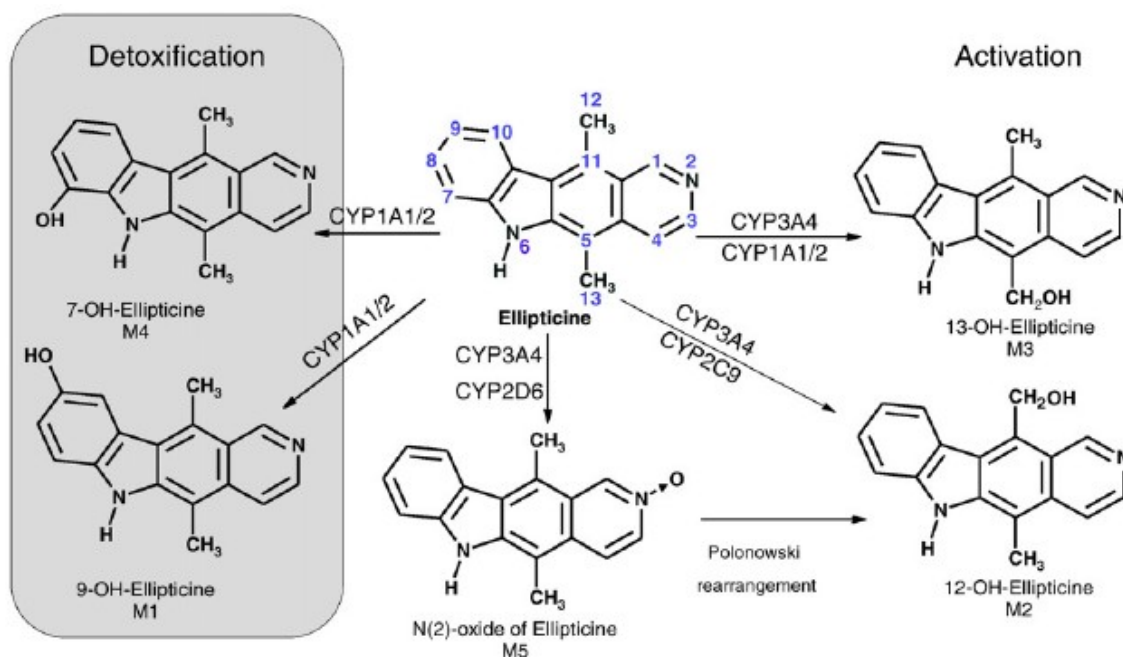
5.2 Enzymy metabolizující ellipticin

Nově popsaným mechanismem působení ellipticinu je již zmiňované kovalentní navázání derivátů ellipticinu na DNA. Tento mechanismus je však možný jen tehdy, je-li ellipticin enzymově aktivován na reaktivnější deriváty, a to buď cytochromy P450 nebo peroxidasami.^{26,36} Obě skupiny enzymů oxidují ellipticin, a tím vedou jak k jeho metabolické aktivaci, tak i k jeho detoxikaci. Reakcí vedoucí k detoxikaci ellipticinu vznikají 9-hydroxyellipticin a 7-hydroxyellipticin, tedy polárnější sloučeniny, které mohou

být poté z těla snadněji vyloučeny. Ellipticin také může fungovat jako induktor cytochromů P450, může tedy zvýšit jejich expresi, a to i v nádorových buňkách.³⁷ Aktivní metabolity ellipticinu, 12-hydroxyellipticin, 13-hydroxyellipticin a N²-oxid ellipticinu, které vznikají oxidací ellipticinu katalyzovanou uvedenými skupinami enzymů, tvoří kovalentní adukty s DNA, a to jak *in vitro*, tak i *in vivo*.²⁶ Deoxyguanosin byl identifikován jako cílová báze, na kterou se metabolity ellipticinu generované cytochromy P450 v DNA vážou.^{31,37}

5.2.1 Oxidace ellipticinu katalyzovaná cytochromy P450

Za aktivaci ellipticinu zodpovídají různé isoformy cytochromů P450. Ellipticin je oxidován za tvorby pěti metabolitů (obr. 6). Čtyři metabolity jsou C-hydroxylované deriváty ellipticinu a jeden je N²-oxid ellipticinu. Oxidací ellipticinu cytochromy P450 tedy vznikají 7-hydroxyellipticin, 9-hydroxyellipticin, 12-hydroxyellipticin, 13-hydroxyellipticin a N²-oxid ellipticinu.



Obr. 6: Oxidace ellipticinu cytochromy P450 za vzniku 5 metabolitů, převzato z³⁷
Rodina 1 cytochromů P450 je zodpovědná převážně za tvorbu 7-hydroxyellipticinu a 9-hydroxyellipticinu, což jsou detoxikační produkty. Zatímco zbylé tři metabolity jsou metabolity aktivační, které vznikají oxidací ellipticinu především CYP3A4, v menší míře pak i jinými cytochromy P450.

Deriváty ellipticinu, **9-hydroxyellipticin** a **7-hydroxyellipticin**, vznikají z ellipticinu oxidací lidskými cytochromy P450, a to především CYP1A1 a CYP1A2,

nicméně se na této oxidaci může podílet i CYP1B1 a CYP2D6, ale v menším rozsahu. Tyto dva metabolity jsou považovány za hlavní detoxikační produkty ellipticinu tvořené *in vitro* i *in vivo*.^{33,37} V případě 7-hydroxyellipticinu nebyla zjištěna žádná jeho cytotoxická aktivita.²⁶ K určení CYP1A1 a CYP1A2 jako hlavních cytochromů P450 oxidujících ellipticin na tyto dva detoxikační produkty vedlo použití dvou selektivních inhibitorů CYP1A1/2, α -naftoflavonu a furafylinu. Způsobují totiž efektivní snížení tvorby 7-hydroxyellipticinu a 9-hydroxyellipticinu.³⁵

13-hydroxyellipticin je jedním z hlavních produktů oxidace ellipticinu cytochromem P450 3A4, nejhojněji exprimovaným cytochromem P450 v játrech. Vzniká ale také jako minoritní metabolit oxidací ellipticinu CYP1A2, CYP2D6 a CYP2C9.³³ Převládající tvorba 13-hydroxyellipticinu z ellipticinu cytochromem P450 3A4 byla vysvětlena za pomoci molekulového modelování. Vodík methylové skupiny C-13 ellipticinu je umístěný v těsné blízkosti kyslíku vázaného na hem CYP3A4 a představuje tak majoritní cíl pro hydroxylaci.^{33,37}

N²-oxid ellipticinu vzniká jako druhý majoritní metabolit oxidace ellipticinu CYP3A4. Lidský CYP2D6 je však v oxidaci ellipticinu za tvorby N²-oxidu ellipticinu mnohem účinnější než CYP3A4.

Za pomoci ketokonazolu, inhibitoru CYP3A4, byla určena účast CYP3A4 na oxidaci ellipticinu za tvorby metabolitů 13-hydroxyellipticinu a N²-oxidu ellipticinu.³⁵ Jelikož je CYP3A4 nejvíce exprimovaným cytochromem P450 v lidských játrech, měla by být oxidace ellipticinu na 13-hydroxyellipticin a N²-oxid ellipticinu majoritní metabolickou dráhou tohoto léčiva v lidských játrech.³⁷

Také poslední derivát ellipticinu, **12-hydroxyellipticin**, může vznikat oxidací ellipticinu CYP3A4, navíc ještě CYP2C9. Tento produkt se nicméně může tvořit také cestou bez enzymové katalýzy. Další možnou cestou tvorby tohoto metabolitu je Polonowského přesmyk z N²-oxidu ellipticinu.³⁵

5.2.1.1 Tvorba kovalentních aduktů DNA s ellipticinem aktivovaným cytochromy P450

Oxidací ellipticinu cytochromy P450 vznikají z ellipticinu metabolity, které jsou schopné se kovalentně vázat na DNA. Tvorba aduktů s DNA *in vitro* byla potvrzena za použití dvou nezávislých metod, metodou „³²P-postlabeling“ a použitím ellipticinu značeného ³H. Touto kovalentní vazbou metabolitů ellipticinu na DNA vznikají minimálně 2 adukty, majoritní adukt 1 a minoritní adukt 2 (obr. 7, str. 36).²⁹ Právě tyto dva adukty jsou převážně zodpovědné za destrukci nádorových buněk.³⁷

Z hlediska tvorby aduktů ellipticinu s DNA jsou významné jeho 3 metabolity, na jejichž vzniku se podílí cytochromy P450. Jsou to 13-hydroxyellipticin, 12-hydroxyellipticin a N²-oxid ellipticinu. Posledně jmenovaný metabolit je Polonowského přesmykem přesmykován na 12-hydroxyellipticin.³⁵ Deoxyguanosin je cílovou bází, na kterou se váží aktivní metabolity ellipticinu, a to v podobě karbeniových ionů, ellipticinu-13-ylum a ellipticinu-12-ylum. Tyto reaktivní agens snadno tvoří adukty 1 a 2. Uvedené karbeniové iony vznikají spontánním štěpením 13-hydroxyellipticinu a 12-hydroxyellipticinu.³⁷

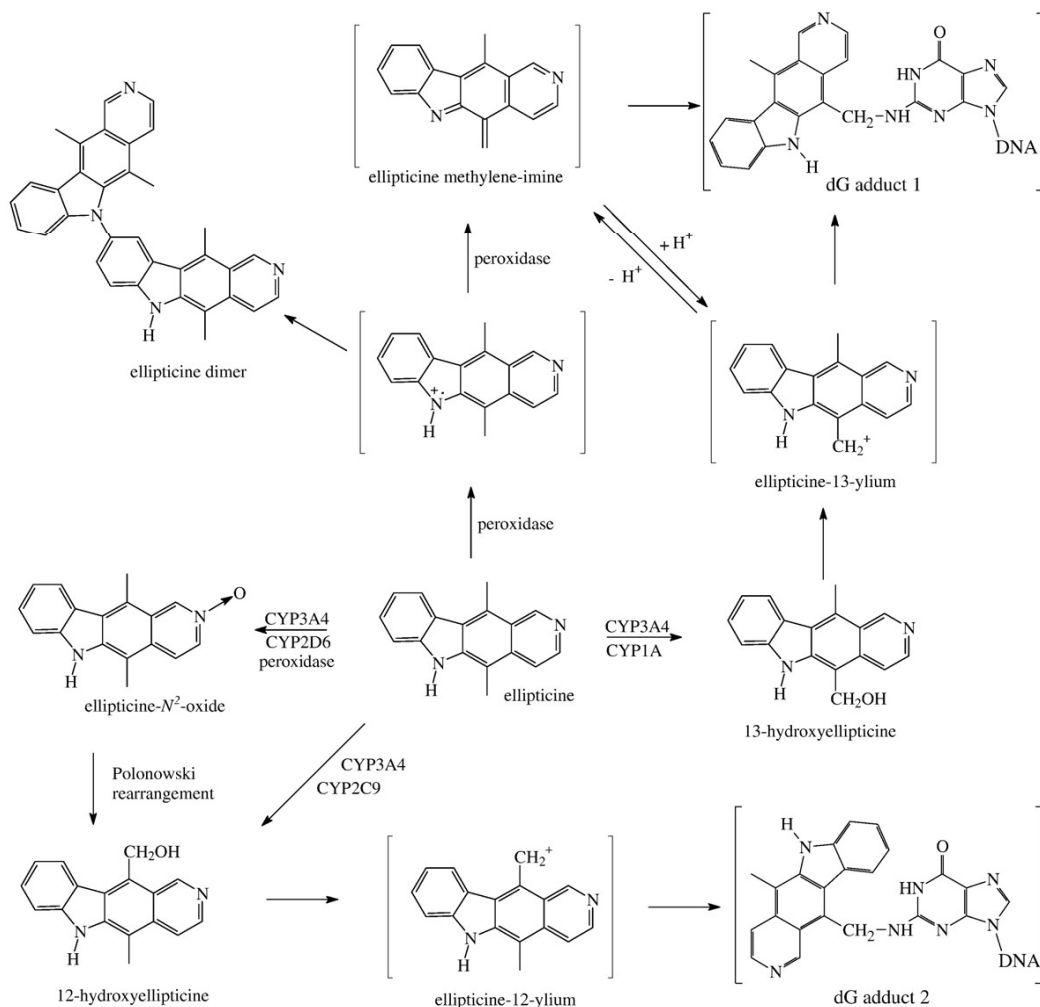
Tvorba **majoritního aduktu 1** začíná oxidací ellipticinu lidskými cytochromy P450, a to převážně CYP3A4 a CYP1A1/2 za vzniku 13-hydroxyellipticinu. 13-hydroxyellipticin se poté spontánně štěpí na ellipticin-13-ylum, který se naváže na deoxyguanosin v DNA (obr. 7, str. 36).³⁷

Minoritní adukt 2 se může tvořit dvěma způsoby:

- 1) Oxidací ellipticinu vzniká jeho metabolit 12-hydroxyellipticin, na jehož tvorbě se podílejí CYP3A4 a CYP2C9, z něho se spontánním štěpením vytvoří reaktivní ellipticin-12-ylum, který se poté váže na DNA.
- 2) Oxidací ellipticinu CYP3A4 a CYP2D6 vznikne N²-oxid ellipticinu. Ten se Polonowského přesmykem přemění na 12-hydroxyellipticin, který se rozštěpí na ellipticin-12-ylum vázající se na DNA (obr. 7, str. 36).³⁷

Tvorba obou reaktivních intermediátů, ellipticinu-12-ylia a ellipticinu-13-ylia, již nevyžaduje zapojení cytochromů P450. Proto jsou 13-hydroxyellipticin a 12-

hydroxyellipticin, které se na tyto reaktivní kationty štěpí spontánně, vhodnými kandidáty pro jejich „zacílení“ do nádorů, v nichž chybí aktivační enzymy.³⁷



Obr. 7: Schéma oxidační aktivace ellipticinu lidskými cytochromy P450 a peroxidasami, Ellipticin je oxidován jak cytochromy P450, tak peroxidasami za vzniku 12-hydroxyellipticinu, 13-hydroxyellipticinu a N²-oxidu ellipticinu. V obrázku je znázorněna tvorba ellipticinových aduktů s DNA, a to z 12-hydroxyellipticinu a 13-hydroxyellipticinu, převzato z³⁶

5.2.1.2 Účinek ellipticinu na expresi cytochromů P450

Ellipticin může také v některých tkáních působit jako induktor cytochromů P450. Týká se to především podrodiny CYP1A, méně pak CYP3A a dále enzymu CYP1B1.^{29,30,37} Pro zkoumání účinku ellipticinu na expresi cytochromů P450 byl jako vhodný model vybrán potkan. V něm má ellipticin podobný osud jako u člověka.^{1,31}

Expres proteinů CYP1A1 a CYP1A2 stejně jako jejich enzymová aktivita jsou významně indukovány ellipticinem, a to v játrech, plicích a ledvinách potkanů vystavených působení ellipticinu.¹ Indukce CYP1A ellipticinem vede k vyšší tvorbě ellipticinových aduktů s DNA. Tato skutečnost zřejmě souvisí se zvýšenou oxidací ellipticinu na 12-hydroxyellipticin a 13-hydroxyellipticin, což jsou metabolity ellipticinu, ze kterých se tvoří dva hlavní adukty s DNA.¹ Zjistilo se, že pro tvorbu majoritního ellipticinového aduktu 1 s DNA v potkanech *in vivo* je důležitý jak CYP3A1, tak i zmiňovaný CYP1A1.³⁷ Avšak v inkubacích *in vitro* má CYP1A1 mnohem menší efektivitu tvořit z ellipticinu adukty s DNA než CYP3A1.^{29,31} Jedním z důvodů vysvětlující tyto pozorované rozdíly byla právě indukce CYP1A1, kterou zprostředkoval ellipticin samotný. Indukce CYP1A1 ellipticinem vede k vyšší hladině proteinů a zvýšené aktivitě *in vivo*.¹

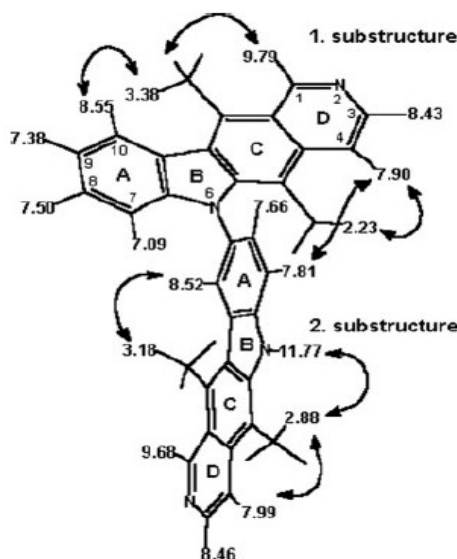
K indukci cytochromů P450 ellipticinem také dochází v lidských buňkách glioblastomu UM87MG. V tomto případě je indukován nejen CYP1A1, ale i CYP1B1 a CYP3A4. Indukcí cytochromů P450 ellipticinem, si ellipticin zvyšuje svůj metabolismus, což vede převážně k aktivaci tohoto léčiva na reaktivní metabolity, které tvoří adukty s DNA. Tím moduluje svůj vlastní farmakologický a genotoxický potenciál.³⁷

Indukce CYP1A1 vyvolaná ellipticinem je pravděpodobně důsledkem navázání ellipticinu na receptor pro polycyklické aromatické uhlovodíky (AhR). Komplex ellipticin-AhR se přemísť do jádra, kde se vytváří dimer AhR s jaderným translokátorem (ARNT). Tento komplex funguje jako aktivátor transkripce, stimulující transkripci genu *CYP1A1*.^{1,37}

5.2.2 Oxidace ellipticinu katalyzovaná peroxidasami

Jak již bylo uvedeno výše, ellipticin po aktivaci cytochromy P450 tvoří kovalentní adukty s DNA. Je proto považován za protnádorové léčivo, které funguje jako pro-léčivo, jehož farmakologické účinky a jeho vedlejší genotoxické efekty jsou závislé na jeho enzymové aktivaci v cílové tkáni.²² Cytochromy P450 jsou hojně exprimovány v několika zdravých tkáních, ale i v cílových nádorových buňkách. Nicméně v jiných tkáních, také citlivých na ellipticin, jsou hladiny cytochromů P450 mnohem nižší. Přesto se zjistilo, že je ellipticin pro tyto buňky cytotoxický a tvoří v nich adukty s DNA. Ellipticin tedy musí aktivovat i jiné enzymy než pouze cytochromy P450. Dalšími enzymy metabolizujícími ellipticin jsou peroxidasy. Některé z těchto enzymů jsou také exprimovány v řadě nádorových buněk.³⁷

Peroxidasas, jako jsou hovězí LPO, lidská MPO, ovčí cyklooxygenasa 1 (COX-1), lidská cyklooxygenasa 2 (COX-2) a křenová peroxidasa (HRP), oxidují ellipticin *in vitro* na metabolity, které se vážou na DNA. Oxidací ellipticinu peroxidasami *in vitro* vznikají převážně 2 metabolity (obr. 7, str. 36). Majoritní metabolit je dimer ellipticinu, ve kterém se spojí 2 ellipticinové zbytky přes atom dusíku N6 pyrrolového kruhu jedné z molekul ellipticinu a uhlíkový atom C9 druhé molekuly ellipticinu (obr. 8).³⁴ Během jednoelektronové oxidace metabolizují peroxidasy ellipticin na volné radikály. Volné radikály poté vytvářejí další metabolity, jako je uvedený ellipticinový dimer nebo adukty s DNA.³⁷ Když vezmeme v úvahu strukturu dimeru ellipticinu, první tvořený radikál by měl být kationradikál na atomu dusíku N6 pyrrolového kruhu.³⁴



Obr. 8: Struktura dimeru ellipticinu, který vzniká oxidací ellipticinu peroxidasami, převzato z³⁴

5.2.2.1 Tvorba kovalentních aduktů DNA s ellipticinem aktivovaným peroxidasami

Tvorba kovalentních aduktů ellipticinu s DNA *in vitro* po jeho oxidaci peroxidasami byla prokázána dvěma nezávislými metodami, metodou „³²P-postlabeling“ a použitím ellipticinu značeného ³H.^{34,37}

Jak je patrné z obrázku 7 (str. 36), adukt 1 tvořený z ellipticinu s DNA, který vznikl oxidací ellipticinu peroxidasami, je stejný jako adukt 1, který vytváří karbeniový ion ellipticin-13-ylum. Reakcí katalyzovanou cytochromy P450 vzniká 13-hydroxyellipticin, z něhož se poté tvoří právě tento karbeniový ion. Z obrázku 7 (str. 36) je tedy zřejmé, že

dvě různé cesty, katalyzované dvěma různými skupinami enzymů, vedou ke stejnému produktu, majoritnímu aduktu 1. 13-hydroxyellipticin vystupuje i jako prekursor meziproduktu, ellipticin-methyleniminu, který se také kovalentně váže na DNA a tvoří tak adukt 1 s DNA. Methylenimin ellipticinu vzniká oxidací ellipticinu peroxidasami. Minoritním produktem oxidace ellipticinu peroxidasami je opět N²-oxid ellipticinu, tedy stejný produkt, který vznikne z ellipticinu i oxidací lidskými cytochromy P450.^{34,36,37}

N²-oxid ellipticinu slouží jako prekursor pro tvorbu dalšího ellipticinového metabolitu, 12-hydroxyellipticinu. Ten vzniká Polonowského přesmykem právě z N²-oxidu ellipticinu. Navíc je také zodpovědný za tvorbu minoritního aduktu s DNA, tedy opět stejného produktu, který vzniká z ellipticinu i oxidací lidskými cytochromy P450. Stejně jako v případě 13-hydroxyellipticinu vzniká z 12-hydroxyellipticinu také karbeniový ion, ellipticin-12-ylum, který reaguje s nukleofilními centry deoxyguanosinu v DNA a vytváří tak adukt 2 (obr. 7, str. 36).

6 Závěr

Na celém světě si vědci uvědomují, jak důležité a přínosné jsou znalosti o účinku enzymů, které jsou schopné metabolizovat xenobiotika. Mezi xenobiotika zahrnujeme i léčiva, z medicinského hlediska budou tedy jednou informací o působení takovýchto enzymů nepostradatelné. Znalosti o působení enzymů, o jejich zastoupení u jednotlivých pacientů, by mohly poskytnout velmi cenné informace lékařům, kteří by tak mohli pacientovi navrhnout účinnější individuální léčbu. Léčba by tak přesně odpovídala potřebám pacienta a jeho schopnosti na danou léčbu reagovat.

Tuto skutečnost si vědci uvědomují, proto jsou enzymy schopné metabolizovat právě léčiva předmětem výzkumu mnoha laboratoří po celém světě. V posledních několika letech se zájem laboratoří zaměřuje na jedny z nejvýznamnějších enzymů, které metabolismus léčiv katalyzují, na cytochromy P450. Konkrétně též na studium jednotlivých zástupců patřících do této velké superrodiny enzymů. Nejvíce jsou cytochromy P450 exprimovány v játrech, kde se účastní první fáze biotransformace xenobiotik, nicméně jsou exprimovány i v řadě dalších tkání. Dalším důvodem pro výzkum cytochromů P450 je i jejich schopnost metabolizovat kromě léčiv také řadu karcinogenů.

Jednotliví lidé se liší nejen celkovým vzhledem, ale také z hlediska „výbavy“ (obsahu) cytochromů P450. Velmi totiž záleží na okolních vlivech, jako je prostředí, ve kterém žijeme, nebo např. na našich stravovacích návycích, na užívaných léčivech nebo na kouření. Všechny tyto faktory mohou ovlivňovat hladinu cytochromů P450 v každém jednotlivci. Některé cytochromy P450 mohou být u jednoho člověka více indukovány než u jiného, to samé platí i v případě, kdy je daný enzym nějakou látkou inhibován. Z toho se potom odvíjí individuální reakce jednotlivců na toxická xenobiotika. Člověk, jehož cytochromy P450 schopné biotransformovat dané xenobiotikum jsou inhibovány, bude mnohem více ovlivněn tímto xenobiotikem, než člověk, který potřebný cytochrom P450 exprimuje. Xenobiotikum proto může metabolizovat na méně nebezpečnou látku. Dalším velmi významným faktorem, který ovlivňuje rozdílnou citlivost jednotlivců vůči xenobiotiku, je genetický polymorfismus cytochromů P450. Všechny tyto faktory dohromady pak přispívají k velké variabilitě aktivit některých cytochromů P450. Skutečně, u jednotlivých lidí se koncentrace těchto enzymů může lišit až 100 násobně.

Veškeré poznatky o cytochromech P450 jednou usnadní léčbu pacientů. Pokud bude mít lékař dostatek informací o pacientově enzymové „výbavě“, tedy především o zastoupení jednotlivých cytochromů P450 v jeho organismu, usnadní mu tyto informace navržení vhodné léčby pro daného pacienta, která tak bude efektivnější. Podle hladin jednotlivých isoform cytochromů P450 bude možné lépe odhadnout, které z případných léků budou pro pacienta vhodné a naopak, na které nebude reagovat.

Vedle cytochromů P450, které patří mezi enzymy schopné metabolizovat léčiva, oxidují léčiva i peroxidasy. Jejich působení bylo ukázáno na protinádorovém léčivu elliptycinu.

Ellipticin se zdá být nejen vhodným protinádorovým léčivem, ale i vhodným modelem studujícím efekt protinádorových léčiv. A to díky jeho vysoké účinnosti proti některým druhům rakoviny a pro malý výskyt vedlejších toxických účinků. Ellipticin je navíc také účinným induktorem pro některé cytochromy P450, čímž může zvýšit jejich expresi, a to jak ve zdravých buňkách, tak i v nádorových. To vše pak vede k potenciaci jeho farmakologického účinku. Jeho aktivací cytochromy P450 a peroxidasami vznikají metabolity, z nichž spontánním štěpením vznikají reaktivní produkty, které již bez účasti enzymů mohou vytvářet adukty s DNA. Ellipticin je tedy v podobě reaktivních metabolitů vhodným kandidátem pro jeho „zacílení“ do nádorových buněk.

Seznam použité literatury

1. Aimová D., Svobodová L., Kotrbová V., Mrázová B., Hodek P., Hudeček J., Václavíková R., Frei E., Stiborová M.: *Drug Metab Dispos*, **2007**, 35, 1926-1934
2. Anzenbacher P., Anzenbacherová E.: *Cell Mol Life Sci*, **2001**, 58, 737 – 747
3. Auclair Ch.: *Arch Biochem Biophys*, **1987**, 259, 1 – 14
4. Buzková H., Pechandová K., Slanař O., Perlík F.: *Cell Biochem Funct*, **2008**, 26, 76–81
5. Coon M. J., Ding X., Pernecky S. J., Vaz A. D. N.: *FASEB J*, **1992**, 6, 669 – 673
6. Furtmüller P. G., Zederbauer M., Jantschko W., Helm J., Bogner M., Jakoptisch Ch., Obinger Ch.: *Arch Biochem Biophys*, **2006**, 445, 199 – 213
7. Guengerich F. P.: *Mol Interv*, **2003**, 3, 194 – 204
8. Guengerich F. P.: *AAPS J*, **2006**, 8, 101 – 111
9. Halpert J. R., Guengerich F. P., Bend J. R., Correia M. A.: *Toxicol Appl Pharmacol*, **1994**, 125, 163 – 175
10. Hukkanen J., Pelkonen O., Raunio H.: *Eur Respir J Suppl*, **2001**, 18, 122 – 126
11. Chromá L., Macková M., Macek T., Martínek V., Stiborová M.: *Chem Listy*, **2001**, 95, 212-222
12. Ingelman-Sundberg M., Oscarson M., McLellan R. A.: *Trends Pharmacol Sci*, **1999**, 20, 342 – 349
13. Ingelman-Sundberg M.: *Pharmacogenomics J*, **2005**, 5, 6–13
14. Kirchheiner J., Seeringer A.: *Biochim Biophys Acta*, **2007**, 1770, 489-494
15. Miners J. O., Birkett D., J.: *Br J Clin Pharmacol*, **1998**, 45, 525 – 538
16. Nelson D. R.: *Arch Biochem Biophys*, **1999**, 369, 1 - 10
17. Nelson D. R., <http://drnelson.uthsc.edu/talks/P450lect.2009.pdf>, staženo 18.3.2011
18. O'Brien P. J.: *Chem Biol Interact*, **2000**, 129, 113 – 139
19. Ohashi M., Sugikawa E., Nakanishi N.: *Jpn J Cancer Res*, **1995**, 86, 819 - 827

20. Ortiz de Montellano P. R.: *Cytochrome P450: Structure, Mechanism, and Biochemistry*; Plenum Publisher: New York, **2005**
21. Pelkonen O., Mäenpää J., Taavitsainen P., Rautio A., Raunio H.: *Xenobiotica*, **1998**, 28, 1203 – 1253
22. Poljaková J., Forsterová K., Šulc M., Frei E., Stiborová M.: *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub*, **2005**, 149, 449 – 453
23. Scordo M. G., Aklillu E., Yasar U., Dahl M.-L., Spina E., Ingelman-Sundberg M.: *Br J Clin Pharmacol*, **2001**, 52, 447 - 450
24. Schwaller M.-A., Allard B., Lescot E., Moreau F.: *J Biol Chem*, **1995**, 270, 22709-22713
25. Spivack S. D., Hurteau G. J., Reilly A. A., Aldous K. M., Ding X., Kaminsky L. S.: *Drug Metab Dispos*, **2001**, 29, 916 – 922
26. Stiborová M., <http://archiv.otevrena-veda.cz/users/Image/default/C2Seminare/MultiObSem/001.pdf>, staženo 26.2.2011
27. Stiborová M. Asfaw B., Anzenbacher P.: *FEBS Lett*, **1988**, 232, 2, 387-390
28. Stiborová M., Hudeček J., Hodek P., Frei E.: *Chem Listy*, **1999**, 93, 229 – 237
29. Stiborová M., Bieler Ch. A., Wiessler M., Frei E.: *Biochem Pharmacol*, **2001**, 62, 1675–1684
30. Stiborová M., Frei E.: *Chem Listy*, **2001**, 95, 549 – 555
31. Stiborová M., Stiborová-Rupertová M., Bořek-Dohalská L., Wiessler M., Frei E.: *Chem Res Toxicol*, **2003**, 16, 38-47
32. Stiborová M., Hudeček J., Páca J. Jr., Martínek V., Páca J.: *Chem Listy*, **2004**, 98, 876 – 890
33. Stiborová M., Sejbal J., Bořek – Dohalská L., Aimová D., Poljaková J., Fosterová K., Rupertová M., Wiesner J., Hudeček J., Wiessler M., Frei E.: *Cancer Res*, **2004**, 64, 8374-8380
34. Stiborová M., Poljaková J., Ryšlavá H., Dračínský M., Eckschlager T., Frei E.: *Int J Cancer*, **2006**, 120, 243–251

35. Stiborová M., Rupertová M., Schmeiser H. H., Frei E.: *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub*, **2006**, *150*, 13–23
36. Stiborová M., Arlt V. M., Henderson C. J., Wolf C. R., Kotrbová V., Moserová M., Hudeček J., Phillips D. H., Frei E.: *Toxicol Appl Pharmacol*, **2008**, *226*, 318 - 327
37. Stiborová M., Rupertová M., Frei E.: *Biochim Biophys Acta*, **2011**, *1814*, 175 – 185
38. Williams P. A., Cosme J., Vinkovic D. M., Ward A., Angove H. C., Day P. J., Vonrhein C., Tickle I. J., Jhoti H.: *Science*, **2004**, *305*, 683 – 686

Svoluji k zapůjčení této práce pro studijní účely a prosím, aby byla řádně vedena evidence vypůjčovatelů.

[illegible]